Studien mit künstlich in vitro erzeugten Antigenen und Antikörpern.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

K. B. Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

Eduard Schubert

aus Nürnberg,

II. Assistent an der k. Universitäts-Augenklinik in Erlangen.

ACAD. LUGDBAT. BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 1908.

Erlangen.

K. B. Hof- u. Univ.-Buchdruckerei von Junge & Sohn.

1908

118

Gedruckt mit Genehmigung der hohen medizinischen Fakultät der Universität Erlangen.

Referent: Herr Prof. Dr. Heim.
Dekan: Herr Prof. Dr. Graser.

Inhaltsübersicht.

Einleitung.

I. Die Einwirkung des Antikenotoxins auf Leukozyten.

II. Das Kenopräzipitin und seine spezifische Reaktion.

Einfluß von Säure auf die Reaktion.

Einfluß von Hitze auf die beiden Komponenten der Reaktion.

Darstellung von kenopräzipitabler Substanz aus Hühnereiweiß und aus Milch.

III. Nachweis der Spezifität der Bindung von Kenotoxin und Antikenotoxin durch die Bordetsche Komplementfixation.

IV. Schlußsätze.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542703_0067

Einleitung.

Die von Herrn Privatdozenten Dr. W. Weichardt im hygienischen Institute der Universität Erlangen gemachte Entdeckung, daß zweifellose Antigene und Antikörper mit Umgehung des tierischen Körpers aus nativem Eiweiß dargestellt werden können, ist sicherlich nicht nur in theoretischer, sondern auch in praktischer Hinsicht außerordentlich wertvoll.

Durch Herrn Professor Heim hierauf aufmerksam gemacht, habe ich die Gelegenheit ergriffen, dieses neue Forschungsgebiet kennen zu lernen und mich an den Studien des Herrn Dr. Weichardt zu beteiligen.

Ich fand sehr bald, daß die Verhältnisse auf diesem neuen Gebiete zwar kompliziert, aber doch nicht so schwer zu erfassen sind, wie so mancher noch immer geneigt ist, zu glauben.

Daher ist es mir auch möglich geworden, mit relativ einfachen Mitteln eine Reihe von Untersuchungen auf diesem Gebiete zu einem gewissen Abschluß zu bringen.

Ein kurzer Uberblick über die bis jetzt festgestellten Tatsachen auf diesem Gebiete sei vorausgeschickt:

Die Studien gingen bekanntlich aus von der Auffindung der anfangs als Ermüdungstoxin beschriebenen, später als Kenotoxin bezeichneten toxischen Substanz, die sich aus den Muskeln übermüdeter Tiere gewinnen läßt, indem man sie auspreßt, den Preßsaft dialysiert und den von Salzen und dialysablen Substanzen gereinigten Dialyserückstand im hohen Vakuum bei 25° eindunstet.

Spritzt man eine wässrige Lösung der so gewonnenen braunen Schüppchen kleinen Tieren ein, so werden diese schlaff und müde, dann soporös; dabei sinkt ihre Körpertemperatur bis unter 33° und die Atmung wird verlangsamt, bei hohen Dosen bis zum Stillstand.

Das Blutserum größerer, mit dem Kenotoxin wiederholt injizierter Tiere wird antikenotoxinhaltig und schützt, gefüttert oder injiziert kleinere Versuchstiere gegen die Wirkung großer Dosen des Kenotoxins[1] [2] [3].

Später wurde beobachtet, daß Kenotoxin auch außerhalb des Tierkörpers und zwar bei chemischer Erschütterung von nativem Eiweiß bei Temperaturen unter 40° erhalten wird. Hieran reihte sich dann die Beobachtung, daß in der Mischung, in welcher bei gewöhnlicher Temperatur Kenotoxin entsteht, wenn sie zum Sieden erhitzt wird, der für das Kenotoxin spezifische Antikörper auftritt[4].

Allerdings sind es nur äußerst geringe Mengen dieser interessanten Stoffe, welche bei den beschriebenen Verfahren gewonnen werden. Immerhin erlangt man mittels der Dialyse Präparate, mit denen alle Wirkungen des Kenotoxins und Antikenotoxins genau so studiert werden können, wie mit den gleichen im Tierkörper produzierten Substanzen.

Nach und nach ist es Weichardt übrigens gelungen, mittels Extraktionsmethoden durch Azeton, Methylalkohol u. a. Präparate herzustellen, welche wirksam genug sind, um auch an größeren Tieren zu experimentieren und sogar beim Menschen deutliche Wirkungen hervorzubringen[5].

Zu ausgiebigen therapeutischen Versuchen sind allerdings die zu beschaffenden Mengen der immerhin noch kostbaren Stoffe bis jetzt noch nicht recht ausreichend. Mir selbst wurden zu Laboratoriumsversuchen stets genügende Mengen zur Verfügung gestellt.

I. Die Einwirkung des Antikenotoxins auf Leukozyten.

Nachdem die Chemotoxis von Stahl und de Bary entdeckt und zum erstenmal von Peckelharing an Leukozyten beobachtet war[6]), indem mit Milzbrand getränkte Watte die weißen Blutkörperchen anzog, war es zunächst Leber[7]), der dieses Phänomen eingehender studierte. Er führte Glaskapillaren, die mit stark verdünnten Metallsalzlösungen gefüllt waren, bei Kaninchen in die vordere Augenkammer ein und fand, daß, je löslicher die verwendeten Substanzen und je geringer die Konzentration, desto stärker die Anlockung auf die Leukozyten war. Leber beschäftigte sich schon mit der Frage, ob die nekrotisierend d. h. als Protoplasmagift wirkenden Agentien als solche chemotaktisch wirken, oder ob es die entstehenden Eiweißzersetzungsprodukte wie Kreatin, Ammoniak, etc. seien Ferner beobachtete er bei abgetöteten Bakterienkulturen eine ebenso ausgesprochene Chemotoxis wie bei virulenten.

Massart und Bordet führten auf diese Beobachtung hin den Begriff der taktilen und der chemischen Empfindlichkeit ein. Für die letztere entschied sich Gabritschewsky nach eingehenden Untersuchungen, die er mit subkutan in dem Kaninchenohr eingelegten Glaskapillaren vornahm.

Auch bei der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode gewählt, die als die chemisch einfachste sich sehr gut bewährte. Gabritschewsky fand, daß zu einer Auf-

schwemmung von Karmin z. B. wenig Leukozyten hinwanderten. Auch konnte die Erscheinung durch kein passives Einfließen von Flüssigkeitsströmen bedingt sein, sonst hätten sich in Kapillaren mit 10% Neutralsalzlösung massenhaft eingeschwemmte Leukozyten finden müssen.

Die Möglichkeit eines taktilen Reizes ist also auch für unsere Untersuchungen — die Verwendung von Glaskapillaren vorausgesetzt — a priori auszuschalten.

Der Gabritschewskyschen Einteilung folgend in Körper mit positiver Chemotoxis, solche ohne ausgesprochene Chemotoxis und in Substanzen, welche die Leukozyten direkt abstoßen, zog H. Buchner[8]) eine größere Zahl von organischen Stoffen in den Bereich seiner Untersuchungen mit dem Resultat, daß außer den Stoffwechselprodukten der Bakterien und den Pflanzenkaseinen besonders die Umwandlungsprodukte des tierischen Eiweißes in ihrer Reizwirkung auf Leukozyten Interresse erregen.

Buchner gelangte zu der Erkenntnis, daß nur die ersten Umwandlungsprodukte des Eiweißstoffwechsels im Tierkörper sich chemotaktisch positiv verhalten, z. B. Alkalialbuminat aus Muskel, Eidotter; Pepton wirke schon nicht mehr, sehr schwach Tyrosin und Leuzin, gar nicht Harnsäure.

Interessant ist es da nun, zu erkennen, wie das Weichardtsche Antikenotoxin, welches bei chemischer Erschütterung von Eiweiß in der Siedehitze entsteht, wiewohl aus ungeheuren Mengen Eisweiss dargestellt und selbst absolut eiweißfrei*), doch eine sehr starke Reizwirkung im Sinne einer Anlockung auf die Leukozyten ausübt.

---

*) Die Probe mit Alkalilauge und Kuprisulfatlösung ergab keine Spur einer Biuretreaktion.

Selbstverständlich wurden alle Untersuchungen auf aseptischer Grundlage ausgeführt. Die Gabritschewsky-schen Glaskapillaren, welche ca 0,25—0,5 mm weit und 1—2 cm lang sind, wurden $^1/_2$ Stunde bei 160° trocken sterilisiert, ebenso die Instrumente. Die trockene Sterilisation wurde gewählt, um jede Spur etwa chemotoktisch wirkender Flüssigkeiten fern zu halten.

Die zum Versuch verwandte Stelle des Kaninchenohres wird geschoren und mit Alkoholäther desinfiziert. Von einem kleinen Einschnitt aus gräbt man sich in der Subkutis am besten mit der einen Branche einen anatomischen Pinzette eine Tasche, die genügend tief ist, um die Kapillare aufzunehmen. Dabei muß besonders darauf geachtet werden, daß keine Blutung erfolgt. In diese Hauttasche wird die mit der jeweiligen sterilen Lösung gefüllte und an einem Ende zugeschmolzene Kapillare so eingelegt, daß das offene Ende in den Grund der Tasche zu liegen kommt. Die Fixation erfolgt mit Watte und Kollodium. Nie soll man mehr als eine Kapillare in eine Tasche einlegen, vielmehr die Kontrolle am anderen Ohr ausführen, weil durch die stets stattfindende Diffusion des Antikörpers auch eine Leukozytenanlockung in der Kontrollkapillare eintreten könnte.

Um den gesamten Inhalt der Kapillare quantitativ auf seinen Leukozytengehalt untersuchen zu können, kam abweichend von Gabritschewskys Angaben, wonach durch Erhitzen des einen Endes der Kapillare ihr Inhalt auf einen Objektträger ausgepufft wird, folgendes Verfahren zur Anwendung.

In einen Gummistöpsel, der mittelst eines dünnen glühenden Drahtes durchlocht worden ist, wird auf der einen Seite ein mit Gummiballon versehenes Tropfglas gesteckt, auf der anderen Seite die Kapillare, deren zugeschmolzenes Ende zuvor abgefeilt ist. So ist es leicht

möglich, durch einmaliges Drücken des Ballons den ganzen Inhalt der Kapillare auf eine Stelle der Objektträgers auszublasen. Dadurch sind die Vergleichswerte der in einem Gesichtsfeld zu zählenden Leukozyten absolute.

Die lufttrockenen Präparate wurden fixiert und mit wässriger Methylenblaulösung gefärbt.

Der in unseren Versuchen zu prüfende Weichardtsche Antikörper wurde so stark mit steriler 0,85%iger Kochsalzlösung verdünnt, daß 1 Kapillare ungefähr 0,000003% Antitoxin enthielt*). Die Zeit, während der die Kapillaren unter der Ohrhaut des Kaninchens verweilten, betrug zunächst 24 Stunden. Zur Kontrolle wurden stets am anderen Ohr Kapillaren mit derselben 0,85%igen Kochsalzlösung ohne Antikörper eingelegt. Daß auch die Antitoxinlösung steril war, ergab die bakteriologische Untersuchung.

Trotz der enormen Verdünnung zeigte sich nun, daß das Antitoxin in hervorragender Weise leukozytenanlockend wirkt; schon makroskopisch war bei der Entnahme an den mit Antikenotoxinlösung gefüllten Kapillaren deutlich ein 1—2 mm hoher graugelblicher Pfropf sichtbar, während die Kontrollröhrchen ihre völlige Durchsichtigkeit bewahrt hatten.

Mikroskopisch erwies sich der Pfropf als aus polynukleären Leukozyten bestehend, niemals waren Mikroorganismen zu sehen.

In einzelnen Gesichtsfeldern konnten mit Ölimmersion und Okular I (Leitz) bis zu 15 weiße Blutkörperchen gezählt werden. Dagegen waren in den Kontrollen zum

---

*) 1 Tropfen unserer Pipette entsprach 0,003 ccm. Darin waren enthalten 0,0003 Antikenotoxin, da die Stammlösung 10% Antikenotoxin enthielt. Dieser eine Tropfen wurde wieder in 100 ccm 0,85%ige Kochsalzlösung gebracht, so dass 1 ccm davon 0,000003 reines Antikenotoxin repräsentierte.

Teil überhaupt keine, zum Teil nur ganz vereinzelte Leukozyten nachzuweisen, also ein sehr in die Augen springender Unterschied und der absolut sichere Beweis, daß das Antikenotoxin selbst in dieser Verdünnung für Leukozyten chemotaktisch stark positiv ist. Zwei Versuche mit 10 bis 12-stündiger Belassung der Kapillaren im Kaninchenohr brachten dieselben Ergebnisse, nur mit dem Unterschied, daß entsprechend der kürzeren Einwirkung des Antitoxins die Leukozytenzahl eine etwas geringere, aber im Vergleich zu der Kontrolle immer noch sehr hohe war.

Im Gegensatz dazu fehlte bei konzentriert angewendeten Antitoxin die Leukozytenanlockung.

Bei diesen Untersuchungen stellten sich Schwierigkeiten ein, einmal dadurch, daß es nicht möglich war, das Antitoxin in der Kapillare in stärkerer Konzentration d. h. in zähflüssiger Konsistenz über eine Zeit von mindestens 12 Stunden zu erhalten. Immer fand eine starke Diffusion und Verdünnung statt. Ferner war anfänglich das mikroskopische Bild durch starke schwarze Niederschläge unbrauchbar; dieser Übelstand konnte auf folgende Weise behoben werden: Das konzentrierte Antitoxin wurde mit Aqu. dest. versetzt, zentrifugiert und nach Beseitigung des Sediments im Exsikkator wieder auf die gewünschte Konsistenz eingedickt. Aber die Diffusion aus den Kapillaren ließ sich nie vermeiden. Gelang es jedoch, eine relativ hohe Konzentration der Antikenotoxinlösung in den Kapillaren zu erhalten, dann fehlte die Leukozytenwanderung vollkommen. Stark konzentriertes Antikenotoxin ist demnach entweder chemotaktisch indifferent oder sogar ein direktes Gift für die Leukozyten.

II. Das Kenopräzipitin und seine spezifische Reaktion.

Die in dem folgenden Kapitel zu berichtenden Ergebnisse der Erforschung eines neuen Zweiges der biochemischen Untersuchungsmethoden sollen und können nicht den Anspruch erheben, die gewonnenen Tatsachen bis zu den letzten Konsequenzen klar gestellt zu haben, sie sollen vielmehr nur den Weg weisen, auf dem eingehende Nachforschungen sowohl theoretisch als für die Praxis noch viel Interessantes und Nützliches zutage fördern können. Besonders möchte ich schon hier darauf hinweisen, daß sich durch die Entstehung von Antigenen bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf natives Milchweiß für die Kinderheilkunde wichtige Perspektiven allgemeiner und besonderer Art eröffnen.

Je mehr die verschiedensten Seren auf ihre biochemischen Eigentümlichkeiten durchforscht wurden, desto eindringlicher brach sich die Erkenntnis Bahn, daß in ihnen nicht nur eine Gattung freier Rezeptoren vorhanden ist, sondern mehrere, wie Toxine, Hämolysine, Agglutinine u. s. w., die in ihren Eigenschaften nichts miteinander gemein haben und im tierischen Körper offenbar mit den verschiedensten voneinander ganz unabhängigen Verrichtungen betraut sind.

Eine Gruppe dieser Substanzen bilden die von Tschistowitsch und Bordet erkannte Präzipitine, die nicht wie andere Antikörper Veränderungen an

intakten Zellen hervorrufen, sondern gelöste Substanzen aus klaren Lösungen ausfällen. Dieser Umstand brachte für die exakte Forschung den stets anzustrebenden Vorteil, die einschlägigen Untersuchungen und Reaktionen aus dem Tierkörper in das Reagenzglas zu verlegen. Nach der Ehrlichschen Seitenkettentheorie sind bekanntlich die Präzipitine Rezeptoren 2. Ordnung, ausgerüstet mit einer fällenden und einer bindenden (haptophoren) Gruppe.

Auf Grund der Erkenntnis Bordets von der Spezifität der Eiweißpräzipitine baute Uhlenhuth seine namentlich für die gerichtliche Medizin so wichtige Methode der biologischen Blutdiagnose auf, wobei ihm noch die Tatsache zu Hilfe kam, daß die Feinheit der Präzipitinreaktion infolge der außerordentlichen Verdünnungsmöglichkeit alle rein chemischen Erkennungsmethoden übertrifft [10]).

Auch Eiweißkörper, die außerhalb des Körpers durch Einwirkung chemischer Agentien eine molekulare Umwandlung d. h. eine Denaturierung erfahren haben, sind präzipitationsfähig. Bei der Denaturierung entstehen einerseits Toxine und Antitoxine, anderseits präzipitable Substanzen und Präzipitine. Hinsichtlich der ersteren, über die toxischen Wirkungen des Antigens auf Mäuse und über die passive Immunisierung durch das Antitoxin liegen die eingehenden Versuche und Abhandlungen von Weichhardt [1]) vor.

Über das Vorhandensein von letzteren soll hier berichtet werden. Wie der nachfolgende Versuch beweist, reagieren Toxin und Antitoxin enthaltende Lösungen mit Präzipitation aufeinander.

Das klare frisch bereitete Toxin wurde zweimal filtriert und das Filtrat in sterilen Reagenzgläsern folgendermaßen verdünnt.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Toxin	5,0	5,0	5,0	3,0	3,0	3,0	10,0	6,0
Aqu. dest	5,0	5,0	5,0	6,0	6,0	6,0	—	3,0
24 Std. bei ° C.	37	20	0	37	20	0°	37	37

Der Inhalt sämtlicher Gläser blieb klar.

Der Antikörper, ein Testpräparat, wurde zehnfach mit sterilem destillierten Wasser verdünnt und die erhaltene leicht saure Lösung schwach alkalisch gemacht, so daß sie einer N/100-Natronlauge entsprach; sie war vollkommen klar und von goldgelber Farbe.

Bei allen folgenden Versuchen gelangte die sehr handliche Hausersche Methode zur Anwendung. Sie liefert vollkommen eindeutige Ergebnisse und bietet den großen Vorteil, daß man mit überaus geringen Mengen Materials auskommt, was bei den enorm geringen Ausbeuten an Weichardtschem Antikörper (auch aus sehr großen Mengen Eiweiß) hier besonders ins Gewicht fällt.

Bezüglich der Ausführung verweise ich auf die früheren Veröffentlichungen[9]).

Bei unseren Untersuchungen wurde streng darauf geachtet, daß sich die spezifisch schwere Flüssigkeit stets unten in der Kapillare befand, also zuletzt angesogen wurde. Läßt man die spezifisch schwere Flüssigkeit zuerst aufsteigen, dann mischen sich die beiden reagierenden Flüssigkeiten bald und man bekommt statt der charakteristischen Ringe diffuse Trübungen.

Bei einer derartigen Zusammenbringung von Toxin- und Antitoxinlösungen erhielt man nachstehende Ergebnisse:

1. Unverdünntes Toxin (Nr. 7) + Antitoxin: es zeigt sich an der Berührungsstelle der beiden Schichten sofort eine deutliche Präzipitation in Gestalt eines grauweißen Ringes.

2. Mäßig verdünntes Toxin (Nr. 8) + Antitoxin: sofortige Präzipitation.

3. Verdünntes Toxin (Nr. 1, 2 und 3) + Antitoxin nach 15—20 Sek. Auftreten eines scharf begrenzten Ringes.

4. Stärker verdünntes Toxin (Nr. 4, 5 und 6) + Antitoxin desgleichen.

Nach längerem Stehen senken sich die Präzipitate in 2, 3 und 4 allmählich zu Boden.

Selbstverständlich wird angesichts dieses Resultates der Einwand erhoben werden, daß die hier zutage tretende Reaktion nicht als Präzipitation durch Vereinigung von präzipitierender und präzipitabler Substanz aufzufassen sei, sondern daß man es mit einer ganz gewöhnlichen chemischen Fällungsreaktion zu tun habe. Das ist aber, wie die folgenden Untersuchungen darlegen, nicht der Fall, vielmehr ist tatsächlich das zur Toxinbereitung benutzte Eiweiß durch die dabei angewendete Behandlung in seiner konstitutiven Struktur verändert und aus ihm kenopräzipitable Substanzen abgespalten worden.

Um dies zu beweisen, ließen wir zunächst das spezifische Kenopräzipitin auf ganz frisches natives Hühnereiweiß einwirken:

Ein solches wurde ähnlich wie das Toxin in Versuch I, jedoch teils mit destilliertem Wasser, teils mit 0,9 %iger Kochsalzlösung wie folgt verdünnt.

1.	Ein Teil Eiweiß + 1 Teil Aqu. dest.	24 Stunden Brutschrank
2.	3 Teile Eiweiß + 6 Teile Aqu. dest.	1. und 2. trübt sich nach einigen Tagen, 3. und 4. bleibt klar
3.	1 Teil Eiweiß + 1 Teil NaCl-Lösung	Filtration
4.	3 Teile Eiweiß + 6 Teile NaCl-Lösung	Klare Lösungen.

Diese klaren Lösungen wurden mit zehnfach verdünntem Antitoxin versetzt; darauf zeigte sich in keinem Falle auch nur die Spur einer Trübung an der Berührungsstelle, selbst nicht nach viertägigem Stehen.

Also natives (Hühner-)Eiweiß gibt mit Antitoxin bezw. Kenopräzipitin keine Reaktion. Aber Zubereitungen von Eiereiweiß, wie sie bei der fabrikmäßigen Darstellung von Albumen ovi siccum statthaben, stellen Eingriffe dar, die im Sinne einer Denaturierung eine Veränderung der konstitutiven Struktur bewirken, wie folgender Versuch beweist:

3 g Albumen ovi siccum werden, um das Mengenverhältnis bei der Toxinbereitung zu wahren, in 60 g sterilem destilliertem Wasser gelöst und klar filtriert.

Bei Zusatz von Kenopräzipitin zeigt sich eine wenn auch nicht sehr kräftige, so doch deutliche Präzipitinreaktion. Sie kann natürlich bei weitem nicht so stark sein, als die Reaktion, welche albumen ovi siccum gibt, das absichtlich zur Erzeugung von kenopräzipitabler Substanz verarbeitet worden ist.

Einflufs von Säure auf die Reaktion.

Kenopräzipitinreaktionen können gestört werden, wenn Säure, Alkali oder Salze in zu großer Konzentration vorhanden sind, wie ich bei Verwendung von HCl, NaOH und NaCl in mehrfachen Versuchsreihen erfahren habe.

Vor solchen grob chemischen Fällungen und nicht spezifischen Reaktionen ist man vollkommen geschützt, wenn man sowohl die präzipitierende als auch die Flüssigkeit, welche die präzipitable Substanz enthält, auf einen schwachen Alkaleszensgrad gebracht hat, der etwa dem einer $^1/_{100}$ Normalnatronlauge entspricht.

Es ist nötig, daß man neben der Röhre, in der die eigentliche Kenopräzipitinreaktion vor sich gehen soll, je eine Röhre, sowohl mit Kenopräzipitin als auch mit kenopräzipitabler Substanz zur Kontrolle ansetzt. Diese beiden Röhren müssen während des Versuchs völlig klar bleiben.

Ein Beispiel, wie Säure das Zustandekommen der Reaktion vereitelt, ist folgendes:

250 ccm reine, filtrierte, mit Salzsäure neutralisierte und wieder filtrierte Normaltoxinlösung wurde im Vakuum mit Hilfe der Wasserstrahlluftpumpe bei 36 mm Quecksilberdruck allmählich zu 45 ccm Toxin eingedickt, wobei genau darauf geachtet wurde, daß die Temperatur nie über 40° stieg, um eine etwaige Inaktivierung des Toxins zu vermeiden. Wenn dieses konzentrierte Toxin mit Salzsäure soweit angesäuert wurde, daß die Reaktion mit Lackmuspapier gerade angedeutet war, zeigte sich eine kleinflockige Ausfällung von Eiweiß, die sich durch Filtrieren leicht beseitigen ließ. Die klare Lösung wurde im Dialysator von ihren Salzen befreit. Dieses konzentrierte, nur eine Spur saure Toxin gab mit 10% Antitoxin auch nicht die Andeutung einer Präzipitation.

Sie trat dagegen sofort ein, wenn die Reaktion des konzentriert auf kenopräzipitable Substanz verarbeiteten Eiweißes schwach alkalisch war.

Die interessante Tatsache, daß unsere Präzipitinreaktion nur bei alkalischer Reaktion, nicht bei saurer eintritt, ist mit manchen Beobachtungen der Immunitätsforschung in Beziehung zu bringen, so besonders mit den Entdeckungen von Morgenroth[15]).

Dieser Forscher fand, daß bei Kobra- sowohl wie bei Diphtheriegift Salzsäure selbst in ganz geringer Menge die Bindung des Toxins mit dem Antitoxin nicht zustande

kommen läßt, ja daß man mittelst der Salzsäure sogar imstande ist, bereits eingetretene Toxin-Antitoxinbindungen wieder aufzuheben.

In unserem Falle könnte man sich vorstellen, daß die Salzsäure mit der kenopräzipitablen Substanz eine Bindung eingeht und die Gruppen besetzt, an welche das spezifische Kenopräzipitin bei alkalischer Lösung angreift.

Einfluſs von Hitze auf die beiden Komponenten der Reaktion.

Im Gegensatze zum Kenotoxin, das nach den Untersuchungen Weichardts, rein dargestellt, eine außerordentlich thermolabile Substanz ist, ist die kenopräzipitable Substanz thermostabil. Dasselbe ist beim Kenopräzipitin der Fall. Dieses verschwindet ebenfalls selbst beim wiederholten Kochen nicht aus der Lösung.

Auch das Antikenotoxin ist hitzebeständig, denn es wird bekanntlich bei Siedehitze gewonnen. Beide Substanzen dürfen aber deshalb nicht identifiziert werden. Sie sind verschieden; ein Präparat kann viel Kenopräzipitin und wenig Antikenotoxin enthalten oder umgekehrt.

Ich möchte an dieser Stelle betonen, daß das Kenopräzipitin keinesfalls ohne weiteres mit dem Antikenotoxin identifiziert werden darf, obgleich diese beiden Stoffe thermostabil sind.

Darstellung von kenopräzipitabler Substanz aus frischem Hühnereiweifs und aus Milch.

Frisches Hühnereiweiß gibt, wie dargelegt, mit Kenopräzipitin keine Präzipitation. Dagegen hat sich das fabrikmäßig bereitete Albumen ovi siccum bereits als

schwach reagierend gezeigt; es besteht also nicht mehr aus gänzlich unerschütterten nativen Eiweißmolekülen. Durch eine weitere Behandlung nach Weichardt kann es vollends derart verändert werden, daß es eine starke Fällung mit Kenopräzipitin gibt.

Das bisher zur Toxindarstellung verwendete Eiweiß war albumen ovi siccum (Merck), das, wie wir schon oben gesehen haben, bereits nicht mehr den Anspruch erheben darf, nur aus unerschütterten nativen Eiweißmolekülen zu bestehen. Andererseits war festgestellt worden, daß frisches Hühnereiweiß mit Antitoxin keine Präzipitation gibt.

Es war deshalb vorauszusehen, daß auch aus frischem Hühnereiweiß kenopräzipitable Substanz gewonnen werden kann. Darum wurden 25 g frisches Hühnereiweiß mit 2,5 g 33⅓ %iger NaOH und 25 g 3%iger H_2O_2 versetzt und das Ganze bei 37° 6 Stunden im Brutschrank belassen.

Schon nach dieser außerordentlich kurzen Zeit war mit Antikenotoxin in der Glaskapillare eine deutliche Präzipitation bemerkbar, die nach einem 15stündigen Verweilen im Brutschrank so an Intensität zunahm, daß sie sich in nichts mehr von der Reaktion, wie sie S. 14 bei Toxin und Antitoxin geschildert ist, unterschied.

Ferner war zu vermuten, daß auch anderes Eiweiß durch die gleiche Behandlung in seiner molekularen Zusammensetzung werde erschüttert werden können.

In Hinsicht auf die eminente Bedeutung der Milch, welche diese bezüglich der Ernährung des Menschen und namentlich des Säuglings besitzt, mußte es von besonderem Interesse sein, das Verhalten des Milcheiweißes zu studieren, zumal noch vielfach empfohlen wird, der Milch zur Konservierung alle möglichen Chemikalien, darunter auch Wasserstoffsuperoxyd zuzusetzen, wie dies

ja auch von Behring bei seiner Perhydrasemilch tat. Auf letztere werden wir noch eingehender zurückkommen.

Die Milch legt bei der Untersuchung insofern einige Schwierigkeiten in den Weg, als wir in der Glaskapillare absolut klare Flüssigkeiten brauchen, wenn keine Täuschungen unterlaufen sollen.

Um dies zu erreichen, muß man die Milch, die eine Emulsion darstellt, einmal sehr stark verdünnen, und dann das Fett nach Möglichkeit entfernen. Frisch gemolkene Kuhmilch wird energisch zentrifugiert und das Fett weggenommen. Es folgt eine Verdünnung von 1 Teil Milch und 2 Teile destilliertem Wasser. Diese Mischung wird wieder zentrifugiert und entrahmt. Dazu darf man, wie Vorversuche zeigten, nicht etwa im Scheidetrichter eine Ausschüttelung mit Äther vornehmen, weil durch eine solche Prozedur das Milcheiweiß schädlich beeinflußt würde. Von dieser Stammlösung zeigte sich bei der nötigen Verdünnung 1:40 mit Antitoxin keine Präzipitation.

Bei allen folgenden Untersuchungen wurde stets diese Kontrolle vorausgeschickt, um den Beweis zu erbringen daß unverändertes Milcheiweiß vorliege.

2 ccm zentrifugierte, mit 2 Teilen Wasser verdünnte Milch (Stammlösung) wurden entsprechend der früheren Toxinbereitung mit 1 ccm NaOH (33½%) und 37,0 ccm Wasserstoffsuperoxyd (3%) versetzt und 15 Stunden in den Brutschrank bei 37° gestellt.

Das überraschende Resultat war, daß die etwa 15 Stunden bebrütete Milch nunmehr mit Antitoxin eine deutliche Präzipitation gab.

Nachdem es gelungen war, aus Milcheiweiß kenopräzipatible Substanzen zu erzeugen, mußte es von Interesse sein nachzusehen, ob auch die im Handel käufliche Perhychrasemilch (mit Wasserstoffsuperoxyd vorbehandelte Milch) solche Stoffe enthalte.

Ich versetzte Milchstammlösung, die vorher darauf geprüft war, daß sie nur natives Milcheiweiß enthält, im Verhältnis von 1 : 50 mit 3%igen Wasserstoffsuperoxyd und brachte sie entweder sofort oder nach einiger Zeit mit dem mir zur Verfügung stehenden 10%igem Antikenotoxinpräparat in der Glaskapillare zusammen. Ließ man die Kapillare ½ Stunde senkrecht stehen, dann entstand an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeitsschichten eine Ausflockung.

Trat die Reaktion auch verzögert auf, so wurde doch ihr tatsächliches Vorhandensein in wiederholten Nachprüfungen absolut sicher gestellt und somit der Beweis erbracht, daß Wasserstoffsuperoxyd allein imstande ist, die Milcheiweißmoleküle anzugreifen und kenopräzipitable Substanzen zu erzeugen, die als spezifisch sich in der Kenopräzipitinreaktion kennzeichnen.

Der Sauerstoff der Luft kann diese Erscheinung nicht verursacht haben, denn ließ man Milchstammlösung 1 : 50 mit destilliertem Wasser verdünnt 24 Stunden bis 6 Tage bei 0°, 18° und 37° stehen, so war in keinem Falle mittels der im Antikenotoxin enthaltenen präzipitierenden Substanz durch die spezifische Präzipitinreaktion der Nachweis zu erbringen, daß sich kenopräzipitable Substanz gebildet hatte. Dabei muß ich allerdings bemerken, daß das damals zur Verfügung stehende Kenopräzipitin nach den neuesten Fortschritten auf diesem Gebiet als ein Präparat von mittlerer Stärke bezeichnet werden muß, doch war es für Vergleichsversuche recht gut verwendbar.

Vorstehendes ist für die Beurteilung der sog. Perhydrasemilch von nicht geringem Interesse, denn es kann offenbar nicht gleichgültig sein, wenn man der Milch zur Konservierung Wasserstoffsuperoxyd zusetzt. Man erzeugt dadurch künstlich Abspaltungsantigene und führt damit dem kindlichen Organismus Substanzen, besonders Keno-

toxine, zu, deren Unschädlichkeit zum mindesten nicht bewiesen ist.

Wenn auch nach Weichardt eine aktive Immunisierung des Körpers durch Kenotoxin möglich ist, ja sogar „eine Aktivierung protoplasmatischer Substanz", so hat man doch die Dosierung gar nicht in der Hand, besonders bei schwächlichen Säuglingen, bei denen erfahrungsgemäß die Antikörperbildung gering ist, wird man sehr leicht Schaden stiften [12]). Das ist durch die Erfahrung in der ärztlichen Praxis längst bestätigt worden; hier liegt eine wissenschaftliche Begründung vor.

Was die Konservierung betrifft, so besteht kein Zweifel, daß Wasserstoffsuperoxyd dazu verwendet werden kann.

Gordan [11]) hat nachgewiesen, daß die Milch durch Zusatz von 0,33‰ H_2O_2 und mehrstündiges Erhitzen auf 50° keimfrei gemacht wird. Der Fachausdruck für eine derartige Behandlung der Milch lautet nach dem Erfinder C. C. L. Budde in Kopenhagen „Buddisieren". Der Autor erwähnt noch, daß zu starker Zusatz von H_2O_2 die Milch ungenießbar macht. Und Much [14]) warnt davor, Perhydrasemilch im Hellen aufzubewahren, da sie sonst einen bitteren Geschmack annimmt.

Wenn auch der Perhydrasemilch nachgerühmt wird, daß sie nach siebenwöchentlichem Verweilen im Brutschrank absolute Keimfreiheit bewahrt, insbesondere auch Tuberkelbazillen abgetötet seien und sogar bei gleichbleibendem Eiweißgehalt das Labgerinnungsvermögen unverändert geblieben sei, so zeigen hinsichtlich der vermeindlichen Unveränderthеit unsere Untersuchungen, daß das Milcheiweiß verändert worden ist; freilich läßt sich dies nicht mit der chemischen Diagnostik erweisen; erst die viel feinere biochemische Untersuchung deckt die Veränderungen auf.

Es bedarf noch des weiteren Hinweises, daß auch der Nahrungsmittelchemiker aus dem Resultat der vor-

liegenden Untersuchung praktischen Nutzen ziehen kann, indem ihm vielleicht die Möglichkeit gegeben ist, mit Hilfe des Antikenotoxins und der Präzipitinreaktion nachzuweisen, ob der Milch H_2O_2 zugesetzt worden ist, oder nicht.

Wie ich nämlich aus der zur Verfügung stehenden Literatur ersehe, fehlte bis jetzt die Möglichkeit, mittels chemischer Reaktionen nach Ablauf einer gewissen Zeit die stattgehabte Einwirkung von H_2O_2 auf die Milch nachzuweisen.

A. Renard[13]) berichtet, daß Wasserstoffsuperoxyd, zu 0,06% einer Milch zugegeben, in 6 bis 8 Stunden zersetzt und dann nicht mehr analysierbar sei; erst 0,15 % H_2O_2 würden von der Milch nicht mehr völlig gespalten. Dieser Überschuß von H_2O_2 kann aber durch Zusatz eines aus entbluteter Rinderleber gewonnenen Fermentes zerstört werden, so daß eine halbe Stunde später bereits nichts mehr von H_2O_2 aufzufinden ist, weil dieses in H_2O und O zerlegt ist. Um so mehr ist es zu begrüßen, wenn durch die Kenopräzipitinreaktion die Möglichkeit gegeben ist, frische Milch von Perhydrasemilch zu unterscheiden.

Nachdem es sich also herausgestellt hat, daß durch Wasserstoffsuperoxyd Kenopräzipitin aus Eiweiß gebildet wird, mußte noch der Versuch gemacht werden, ob auch durch Reduktionsmittel ein ähnliches Resultat erzielt werden kann.

Mit Rücksicht auf die für die Praxis des täglichen Lebens zu gewinnende Erkenntnis wurde das Formalin gewählt, weil es zur Konservierung von Nahrungsmitteln Anwendung gefunden hat.

Frisches Hühnereiweiß im Verhältnis 3:6 mit 0,9% Kochsalzlösung verdünnt, mittels der Präzipitinreaktion darauf geprüft, daß es nicht bereits Abspaltungsantigene enthielt, wurde mit 40%igen Formaldehyd versetzt, so, daß auf 10 ccm Eiweißlösung ein Tropfen Formalin ent-

fiel. Gibt man dazu in der Glaskapillare Antitoxin, so kommt nicht die geringste Trübung zustande, geschweige denn ein Präzipitationsring, selbst nicht, wenn man die Formalineiweißlösung 12 Stunden im Brutschrank stehen läßt.

Formalin verändert demnach das Milcheiweiß in unserem Sinne nicht. Daß es etwa bloß die Reaktion hemme, daß es also wohl kenopräzipitable Substanz bilde, aber das Zustandekommen der Präzipitinreaktion hindere, dieser Einwand ließ sich dadurch widerlegen, daß, wie ich ermittelte, die Präzipitationsreaktion zustande kommt, wenn man die Reinpräparate, entweder die kenopräzipitable Substanz oder das Kenopräzipitin vorher mit Formalin vorbehandelt.

Beim Überblicken der dargestellten Versuche und ihrer Einzelresultate wird man sich des Eindruckes nicht erwehren können, daß hinter all den positiven oder negativen Präzipitinreaktionen ein sie bedingendes Grundprinzip steht.

Es wird aufgefallen sein, daß das Auftreten von Eiweißabspaltungsantigenen stets begleitet ist von dem Vorhandensein einer präzipitablen Substanz. Obgleich letztere qualitativ streng verschieden ist von dem Toxin, scheint doch die Entstehung dieser beiden Körper bei der Erschütterung von nativem Eiweiß unter 40° unzertrennlich miteinander verknüpft und der Nachweis der kenopräzipitablen Substanz geradezu ein Index für das Vorhandensein von Kenotoxin zu sein.

Da also Kenotoxin so innig in statu nascendi mit kenopräzipitabler Substanz physikalisch verbunden ist und wir im Antikenotoxin mittels der darin enthaltenen präzipitierenden Substanz die Möglichkeit besitzen, durch

die Präzipitinreaktion mittelbar Kenotoxin nachzuweisen, so drängt sich die Frage auf, ob in dem Antikenotoxin vermöge der spezifischen Präzipitinreaktion nicht ein Reagens gefunden ist, das uns mit Sicherheit natives Eiweiß von denaturiertem unterscheiden läßt, gleichgültig ob das Kenotoxin durch Erhitzen über 90° bereits zerstört ist oder nicht; denn die kenopräzipitable Substanz ist im Gegensatz zum Kenotoxin thermostabil.

Nach den vorliegenden Untersuchungen darf man wohl sagen, daß das Antikenotoxin als ein solches Reagens angesprochen werden darf, eine Tatsache, die für die praktische Nahrungsmittelbegutachtung wichtig werden kann.

III. Nachweis der Spezifität der Bindung von Kenotoxin und Antikenotoxin durch die Bordetsche Complementfixation.

Nachem Weichardt sowohl durch aktive Immunisierung von Mäusen mittels Kenotoxin als auch durch passive mit Antikenotoxin einwandfrei nachgewiesen hat, daß sich diese Antigen- und Antikörpergruppe spezifisch zueinander verhalten, war es noch von Interesse, auch die Komplementfixationsmethode heranzuziehen, um unsere Anschauungen über die genannten beiden Körper zu festigen; sie vermag das im vorigen Kapitel erörterte Verhalten der präzipitablen Substanz und des Präzipitins zu bekräftigen.

Gelten Gengou und Moreschi als die Begründer der Untersuchungsmethode der Komplementablenkung, so waren es hauptsächlich Bordet, Wassermann, Bruck und Plaut [16]) [17]) [18]) [19]), welche sie so förderten und ausarbeiteten, daß sie in ihrer jetzigen Form unter die biochemischen Untersuchungsmethoden als unentbehrlich einzureihen ist. Sie hat nur den Nachteil, daß sie viel Zeit in Anspruch nimmt.

Die Vorbereitungen bestehen darin, daß zunächst in Zwischenräumen von 8 bis 10 Tagen 2 Kaninchen je 0,3 bis 1 ccm gewaschener roter Hammelblutkörperchen mit steriler Pravazschen Spitze in eine Ohrvene injiziert werden.

Man muß bei späteren Injektionen mit der Dosis sehr vorsichtig sein, da das artfremde Blut als Gift durch das

plötzliche Auftreten der Hämolysine die Tiere kollabieren und unter Umständen unter hochgradiger Dyspnoe plötzlich zugrunde gehen läßt.

Das von mir verwendete Hammelblut wurde im Schlachthof in sterilen Gläsern aufgefangen und durch lebhaftes Schütteln mit Glasperlen defibriniert, dann zentrifugiert, das Serum abgegossen, mit gleichen Teilen steriler 0,9%iger Kochsalzlösung aufgefüllt, umgeschüttelt, wieder zentrifugiert u. s. f. bis eine Aufschwemmung von zweimal gewaschenen roten Hammelblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt war, die zur Einspritzung diente.

Diese erfolgte je achtmal in steigenden Dosen, und in Zwischenräumen von 8—10 Tagen, bis schließlich jedes Kaninchen im ganzen 3,3 ccm intravenös erhalten hatte.

Zur Probe für die Wertigkeit als Serum wurde schon nach der 6. Injektion ein hämolytisches System aufgestellt, das sich als genügend erwies.

Dem einen Tier wurde aus einer Ohrarterie Blut (etwa 10 ccm) entnommen, daraus durch energisches Zentrifugieren ein völlig klares Serum gewonnen und dieses bei 56° inaktiviert.

Lösung A: 1 Tropfen hämolytisches Kaninchenblutserum zu 5 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung (Verhältnis 1 : 100).

Lösung B: 1 ccm gewaschene frische Hammelblutkörperchen zu 20 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung (Verhältnis 5 : 100).

Lösung C: Frisches komplementhaltiges Meerschweinchenserum.

Hierauf wurde gegeben:

In Röhrchen I	In Röhrchen II (Kontrolle)
Von A 1,6 ccm	Phys. NaCl-Lösung 1,5 ccm
„ B 0,5 „	Von B 0,5 ccm
„ C 0,1 „	„ C 0,1 „

Beide Röhrchen I und II wurden für 2 Stunden in den Brutschrank gestellt und dann für 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Es zeigte sich dann, daß in dem Röhrchen I die roten Blutkörperchen völlig gelöst waren, d. h., daß die Lösung durchsichtig lackfarben geworden, während in II noch die undurchsichtige deckfarbene Beschaffenheit des nicht hämolysierten Blutes vorhanden war.

Damit war bewiesen, daß unser Kaninchenserum Hämolysine enthielt, denn die thermostabile Komponente oder wie sie in der Ehrlichschen Auffassung auch benannt wird, der hämolytische Amboceptor löste im Verein mit dem thermolabilen Bestandteil, dem im frischen Meerschweinchenserum enthaltenen Komplement, welches den Ambozeptor reaktiviert, unter den gegebenen Bedingungen rote Hammelblutkörperchen auf.

Solch ein hämolytisches System ist die Basis, auf der es gelingt, den Nachweis zu erbringen, ob irgendein Antigen und Antikörper zusammengehören, d. h. für einander spezifisch sind.

Bringt man nämlich in bestimmtem Mengenverhältnis Antigen und Antikörper — in unserem Falle Kenotoxin und Antikenotoxin — zusammen und läßt sie eine gewisse Zeit aufeinander wirken, so wird bei Gegenwart von frischem Komplement dieses an den Antigen- und Antikörperkomplex fest und unzertrennlich gebunden, falls die beiden Bestandteile derselben nach der Seitenkettentheorie für einander spezifisch sind und passen, „wie der Schlüssel zum Schloß".

Gibt man jetzt noch frische Hammelblutkörperchen und den entsprechenden inaktivierten hämolytischen Ambozeptor dazu, so darf eine Hämolyse nicht eintreten; denn das zu diesem Prozeß unumgängliche nötige Komplement ist bereits mit Beschlag belegt.

Der negative Ausfall der Hämolyse ist also beweisend

für das Vorhandensein eines spezifischen Antigens und Antikörpers, der positive für das Fehlen wenigstens eins von beiden.

Der ganze Versuch wird nach Bordet als der der Komplementablenkung oder besser Komplementfixierung bezeichnet. Ihre neueste Anwendung hat bekanntlich diese biologische Untersuchungsmethode in der Diagnostik der Syphilis erfahren[16]).

Für unsere Zwecke waren nachstehende Lösungen erforderlich, deren richtiges Mengenverhältnis zu erkunden, es verschiedener Versuche bedurfte.

a) Kenotoxin, filtriert, 1 : 50 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

b) Antikenotoxin in zehnfacher Verdünnung.

c) Das Komplement, enthalten im unverdünnten Serum von zentrifugiertem, ganz frisch dem Tier entnommenem Meerschweinchenblut.

d) Hämolytischer Ambozeptor.

Dem „Hammelblut-Kaninchen" werden 50 ccm Blut aus der Karotis entnommen, defibriniert, zentrifugiert. Das Serum wird bei 56° ½ Stunde inaktiviert und kann so im Eisschrank 14 Tage und länger unbeschadet aufgehoben werden. Zum Gebrauch wird das Serum mit der zehnfachen Menge 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

e) Hammelblutkörperchen in der angegebenen Weise gewaschen und im Verhältnis von 0,5 : 10 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt (5 %).

Es wurde streng darauf geachtet, daß die Verdünnungen nur mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen wurden, da z. B. Aqua destillata die Zellen der roten Blutkörperchen sprengt, das Hämoglobin in Lösung bringt und so Hämolysen vortäuscht, die durch grob physikalische Vorgänge bedingt sind und mit Ambozeptor-Komplementwirkung nicht das geringste zu tun haben.

Zur Reaktion wurden etwa 3 ccm fassende Röhrchen genommen und mit den in der Tabelle angegebenen Mengen beschickt. Nach Eingabe von a—c wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm Gesamtmenge ergänzt und das Gemisch ½ Stunde in den Brutschrank gestellt, darauf d und e zugegeben und das Ganze für 4 Stunden in den Brutschrank (37°), danach für 15 Stunden in den Eisschrank gestellt. Eintretende Hämolyse (+) vollzieht sich von oben nach unten fortschreitend.

	1	2	3	4	5	6
a) Kenotoxin	0,5	0,5	—	—	0,5	—
b) Antikenotoxin	—	—	0,1	—	0,1	—
c) Komplement	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—
Phys. Kochsalzlösung bis zu	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	1,0
d) Hämolytischer Ambozeptor	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—
e) Hammelblutkörperchen . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ergebnis: Hämolyse	—	—	—	+	—	—

Beweisend ist der Vergleich von 4 und 5.

Kenotoxin und Antikenotoxin (in 5) haben sich unter Ansichreißen von Komplement gegenseitig abgesättigt und verhinderten durch die vorherige Verankerung des Komplements an ihre Gruppe die Hämolyse der Hammelblutkörperchen, sie sind also für einander spezifisch gewesen.

Es gäbe nur die eine Möglichkeit, daß das Komplement nicht an den Toxin-Antitoxinkomplex herangegangen wäre, sondern an die kenopräzipitable und präzipitierende Substanz.

Das wäre aber praktisch ohne Belang, weil, wie dargelegt wurde, Kenotoxin und kenopräzipitable Substanz einerseits, Antikenotoxin und präzipitierende Substanz anderseits stets gleichzeitig und parallel miteinander in Erscheinung treten, somit eines für die Gegenwart des anderen zeugt.

IV. Schlufssätze.

1. Antikenotoxin (Weichardt) in Verdünnung, selbst in extremer, übt einen starken Reiz auf Leukozyten im Sinne von positiver Chemotoxis aus. Bei Verwendung konzentrierter Antikenotoxinlösungen entsteht eine gegenteilige Wirkung, Indifferenz oder Abstoßung der weißen Blutkörperchen.

2. Das künstlich in vitro erzeugte Kenotoxin enthält eine kenopräzipitable, das Antikenotoxin eine präzipitierende Substanz, die in schwach alkalischen Lösungen zusammengebracht, eine spezifische Kenopräzipitinreaktion ergeben.

3. Kenopräzipitable Substanz und Präzipitinsubstanz sind beide thermostabil.

4. Kenopräzipitable Substanz entsteht nicht nur aus Hühnereiweiß, sondern auch aus nativem Milcheiweiß durch chemische und physikalische Erschütterung bei Temperaturen unter 40°. Eine besondere Rolle spielen dabei NaOH und H_2O_2. — Der Sauerstoff der Luft ist indifferent.

5. Mittels der Kenopräzipitinreaktion kann nachgewiesen werden, daß Perhydrasemilch kenopräzipitable Substanz enthält.

6. Durch die Kenopräzipitinreaktion scheint eine biochemische Untersuchungsmethode gefunden zu sein zur Unterscheidung, ob die konstitutive Struktur von nativem Eiweiß Veränderungen erlitten hat.

7. Durch die Bordetschen Methode der Komplementfixierung ist es gelungen, einen weiteren Beweis für die spezifische Bindung von Kenotoxin und Antikenotoxin zu erbringen.

Ich will die Arbeit nicht schließen, ohne Herrn Professor Heim für das lebhafte Interesse, das er der Arbeit entgegengebracht hat, und Herrn Privatdozent Dr. W. Weichardt sowohl für die Überlassung des Themas als auch für seine liebenswürdige Unterstützung, endlich dafür, daß mir die wertvollen Reinpräparate zur Verfügung gestellt wurden, meinen ehrerbietigen Dank auszusprechen.

Literatur.

1. W. Weichardt: Serologische Studien auf dem Gebiete der experimentellen Therapie. Stuttgart, Ferdinand Enke 1905.
2. Derselbe: Über das Ermüdungstoxin und dessen Antitoxin. M. M. W. 1905 Nr. 26.
3. Derselbe: Über das Eiweißabspaltungsantigen vom Ermüdungstoxincharakter. Zentralbl. f. Bakter. I. Orig.-Bd. 53. S. 312.
4. Derselbe: Weitere Studien mit dem Eiweißabspaltungsantigen vom Ermüdungstoxincharakter — Kenotoxin — und seinem Antikörper. Aktivierung protoplasmatischer Substanz. M. M. W. 1907. Nr. 39.
5. Derselbe: Leistungsgrenzen, deren Messung und Erweiterung. Zeitschrift für Hygiene. Bd. 59. S. 337.
6. Heinz: Handbuch der experimentablen Pathologie und Pharmakologie. Bd. I.
7. Th. Leber: Die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der Entzündung erregenden Schädlichkeiten. Leipzig, Engelmann 1891. S. 423 ff.
8. H. Buchner: Die chemische Reizbarkeit der Leukozyten und deren Beziehung zur Entzündung und Eiterung. Berliner Kl. W. 1890. S. 1084 ff.
9. G. Hauser: Über einige Erfahrung bei Anwendung der serodiagnostischen Methode für gerichtliche Blutuntersuchungen. M. M. W. 1904. Nr. 7. S. 289.
10. Uhlenhuth: Eine Methode zur Unterscheidung von verschiedenen Blutarten, insbesondere zum differenzialdiagnostischen Nachweis des Menschenblutes. D. M. W. 1901. Nr. 6, Nr. 17, Nr. 30.
11. P. Gordan: Eignet sich H_2O_2 zum Sterilisieren der Milch? Zentralblatt f. Bakter. II. Abtlg. Bd. XIII. 1904.

12. A. Böhme: Ernährungsversuche mit Perhydrasemilch. D. M. W. 1906. Nr. 43. S. 1729.
13. A. Renard: Die Konservierung der Milch durch H_2O_2, Revue d'Hygiène 26. S. 97.
14. Much: Über Perhydrasemilch. M. M. W. 1906. S. 1236.
15. G. Morgenroth und K. Willanen: Über den Wiedergewinn des Diphtherie-Toxins aus seinen Verbindungen mit dem Antitoxin. Virchows Archiv Bd. 190. S. 371.
16. A. Wassermann und F. Plaut: Über das Vorhandensein syphilitischer Antistoffe in der Cerebrospinalflüssigkeit von Paralytikern. D. M. W. 1906. No. 44. S. 1769.
17. A. Wassermann: Zur diagnostischen Bedeutung der spezifischen Komplementfixation. B. kl. W. 1907. Nr. 1. S. 12.
18. C. Bruck: Zur forensischen Verwertbarkeit und Kenntnis des Wesens der Komplementbindung. B. kl. W. 1907. Nr. 47. S. 1510.
19. H. Braun: Über den Nachweis der Antigene mittels der Komplementfixationsmethode. B. kl. W. 1907. Nr. 48. S. 1535.
20. Moreschi: Über den Wert des Komplementablenkungsverfahrens in der bakteriologischen Diagnostik. B. kl. W. 1906. Nr. 38.

Lebenslauf.

Ich wurde am 18. Oktober 1883 als Sohn des Augen- und Ohrenarztes Dr. Paul Schubert in Nürnberg geboren. Nachdem ich im Juli 1902 am kgl. Alten Gymnasium zu Nürnberg das Reifezeugnis erworben hatte, studierte ich in Erlangen, Würzburg, München und Kiel Medizin. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im März 1905, das Staatsexamen im November 1907, beide in Erlangen. Seitdem bin ich an der kgl. Universitäts-Augenklinik daselbst als II. Assistent tätig.